

Diversité et sélection des répertoires

I.

A partir de cellules isolées de moelle osseuse de souris, une lignée cellulaire est immortalisée par transfection avec le virus d'Abelson. Après six semaines de culture, la lignée C est clonée et trois sous-clones (C1, C2, C3) sont particulièrement étudiés. Un marquage direct des cellules avec des anticorps anti-isotypiques couplés à la fluorescéine donne les résultats suivants :

Anticorps couplés à la fluorescéine	Lignées cellulaires			
	C	C1	C2	C3
Anti- μ	-	-	+	-
Anti- κ	-	-	+	-

Ces lignées sont cultivées en présence de méthionine ³⁵S. Une expérience d'immunoprécipitation à l'aide d'anti- μ est réalisée à partir du lysat cellulaire de chaque lignée. L'immunoprécipité est réduit et alkylé puis déposé sur un gel d'électrophorèse en présence de SDS. Après migration, le gel est autoradiographié. L'autoradiographie est présentée sur la Figure 1 :

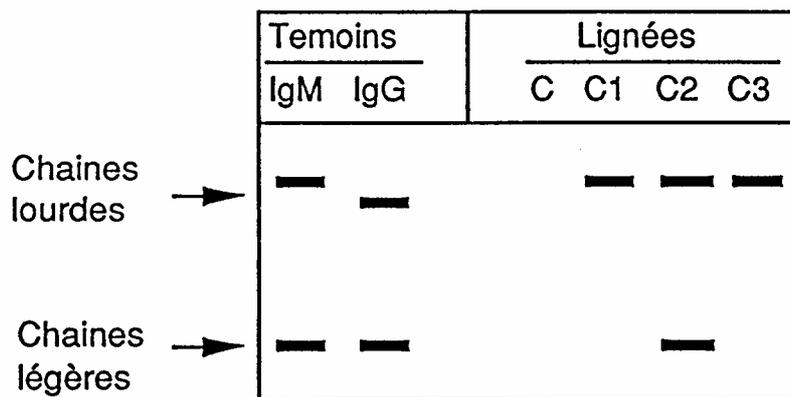


Figure 1

Question 1. Analyser les résultats.

L'ADN de chaque lignée est préparé puis coupé par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse. Après migration, l'ADN est transféré sur des filtres de nitrocellulose. Trois sondes radioactives présentées sur la Figure 2 sont utilisées pour des expériences d'hybridation (technique de Southern) :

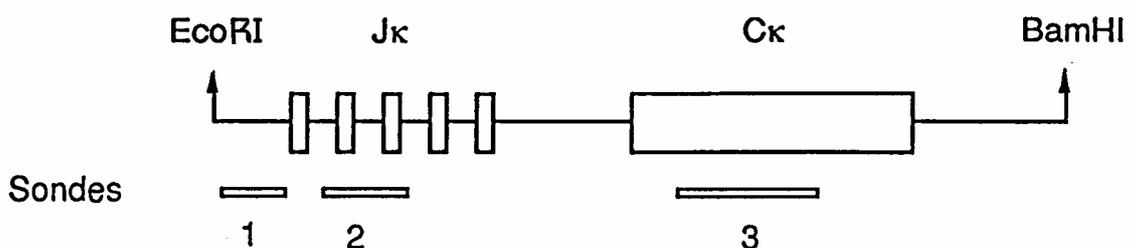


Figure 2

L'autoradiographie des filtres est présentée sur la Figure 3 :

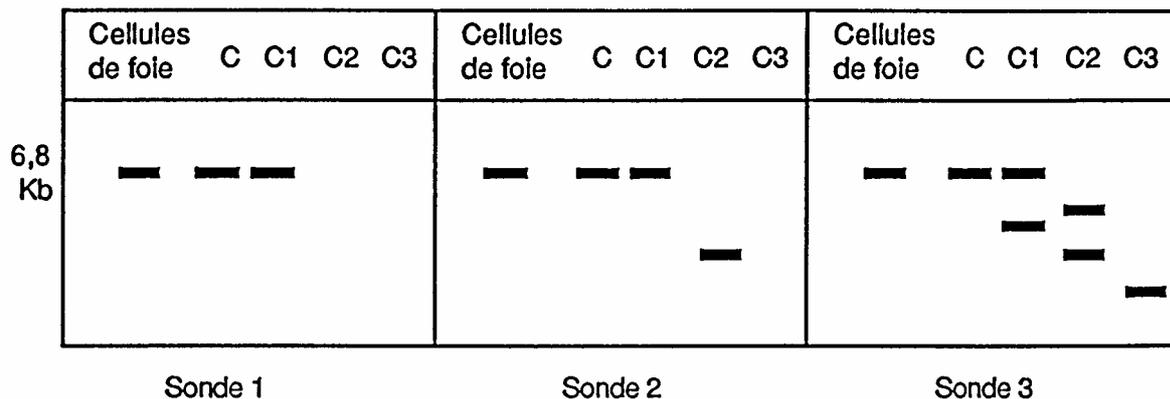


Figure 3

Question 2. Etablissez une corrélation entre l'expression des chaînes d'immunoglobuline et la présence de bandes d'hybridation.

Les lignées C1 et C3 sont cultivées pendant six semaines puis de nouveau clonées. Les mêmes expériences (marquage, immunoprécipitation et technique de Southern) sont réalisées pour l'étude de ces sous-clones. L'ensemble des résultats est présenté sur le Tableau II et les Figures 4 et 5 :

Anticorps couplés à la fluorescéine	Sous-clones de C1			Sous-clones de C3		
	C11	C12	C13	C31	C32	C33
Anti-μ	-	+	+	-	+	+
Anti-κ	-	+	+	-	-	-

Tableau II

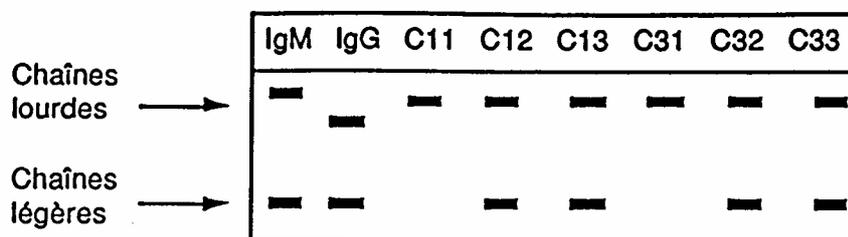


Figure 4: Electrophorèse en présence de SDS

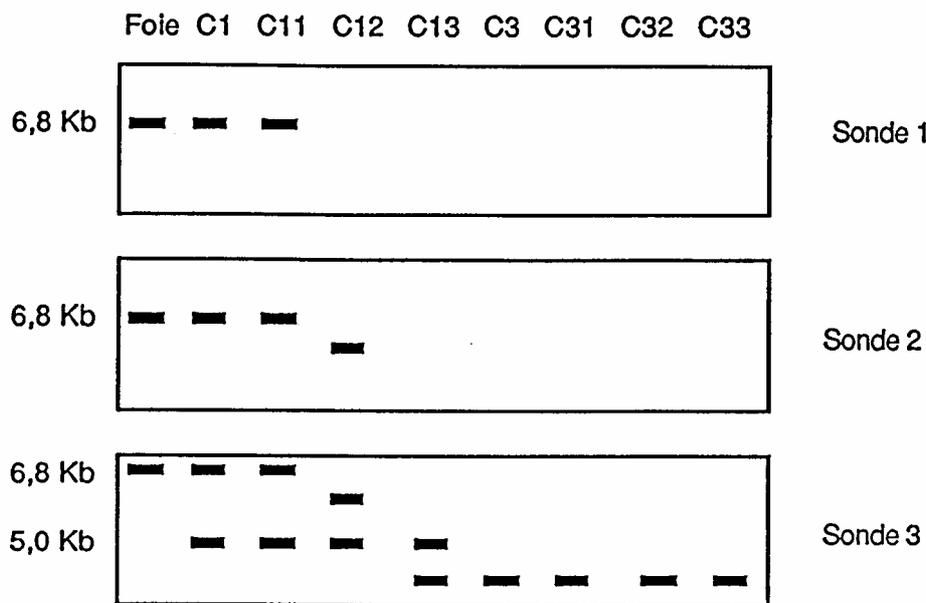
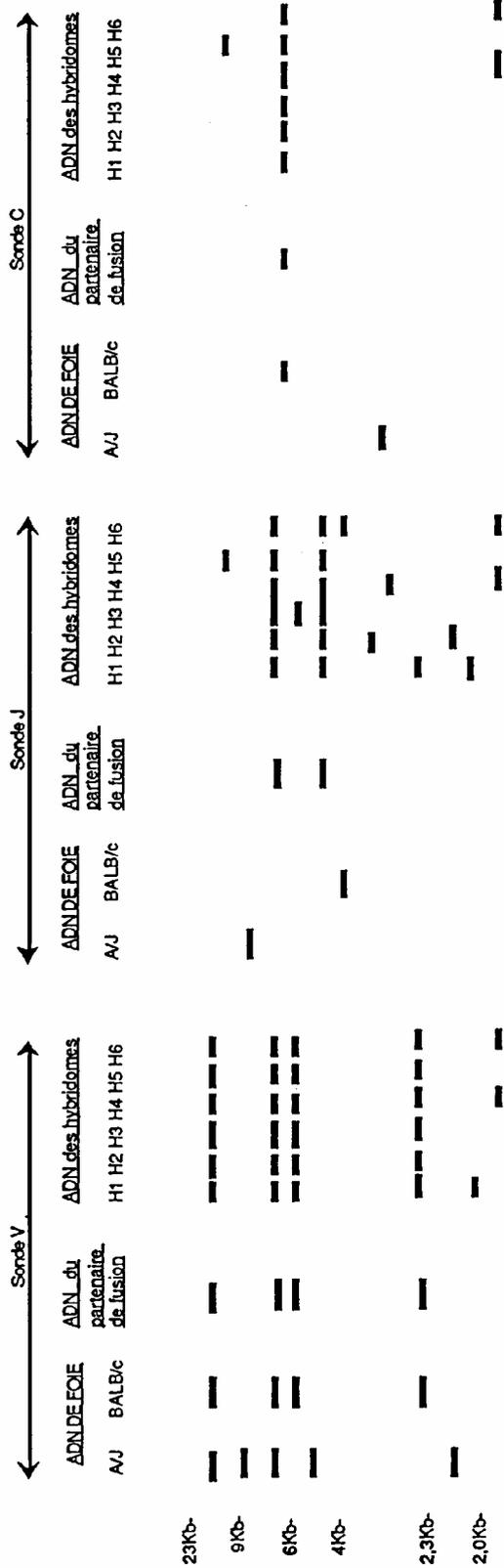


Figure 5: Hybridation de l'ADN génomique digéré

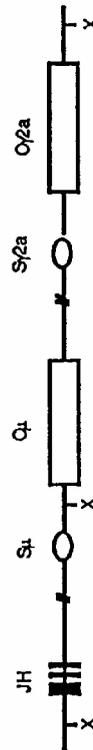
Question 3. Analyser ces résultats. Proposer un schéma explicitant les événements de recombinaison qui se sont produits dans les différentes lignées cellulaires.

II.

Six hybridomes anti-Ars sont obtenus chez la souris BALB/c. H1, H2 et H3 proviennent d'une souris ayant reçu une seule injection de Ars-KLH et H4, H5 et H6 d'une souris ayant reçu deux injections. L'ARNm de l'hybridome H6, d'isotype IgG2a, est purifié afin d'établir une banque d'ADN complémentaire (ADNc). Un clone contenant l'ensemble des segments de gène qui codent la chaîne lourde d'une immunoglobuline (Ig) permet de préparer trois sondes ADN codant pour chacun des segments V, J et C. La configuration de ces segments dans différentes préparations d'ADN est recherchée à l'aide de la technique de Southern. L'ADN des différents hybridomes ainsi que l'ADN de foie de souris BALB/c et A/J sont digérés par l'enzyme de restriction X, déposés sur un gel d'agarose soumis ultérieurement à une migration électrophorétique. L'ADN est ensuite transféré sur un filtre et hybridé avec l'une des sondes. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :



Carte des sites de restriction au locus JH-CH de la souris BALB/c



Interprétez les résultats en rendant compte de :

- la multiplicité des bandes observées au niveau d'une piste ;
- la différence de taille des fragments entre A/J et BALB/c ;
- la présence de bandes supplémentaires avec l'ADN des hybridomes.

III. [pour mémoire]

(D'après Messaoudi *et al.* (2002) *Science* 298:1797)

Dans cette étude, les auteurs analysent la réponse lymphocytaire T contre le virus de l'Herpes (HVH-1) dans deux lignées de souris consanguines. Les auteurs ont montré au préalable que, chez ces souris la réponse est principalement dirigée contre un peptide particulier, le peptide HSV-8p, dérivé d'une protéine du virus, la glycoprotéine B.

Les lignées de souris étudiées sont les lignées C57BL/6 (B6), d'haplotype du CMH H2^b, et B6.C-H-2^{bm8} (bm8), d'haplotype du CMH H2^{bm8}. Ces deux lignées de souris sont génétiquement identiques hormis pour le gène codant la molécule de CMH de classe I H-2K. Les molécules H-2K^b et H-2K^{bm8} diffèrent de quatre acides aminés au niveau du site de fixation du peptide. Ces molécules sont par conséquent identiques pour ce qui est des régions de contact direct avec le TCR mais peuvent différer dans leur capacité à fixer et à présenter certains peptides ; elles peuvent donc différer dans leur capacité à induire les réponses T.

Question 1. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le mode de reconnaissance de l'antigène par le TCR.

Dans une première expérience, la survie des souris B6 et bm8, infectées par des doses croissantes du virus HVH-1, a été observée (Figure 1A). Dans une seconde expérience, les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose donnée de HVH-1 et la survie des souris a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K (Figure 1B).

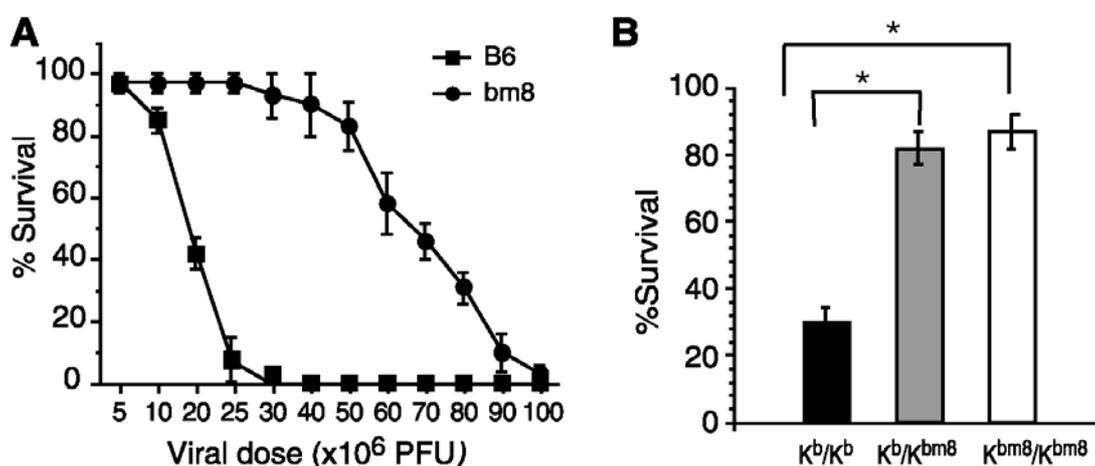


Figure 1 : (A) Les souris B6 et bm8 ont été infectées par des doses croissantes du virus HVH-1 (viral dose). La survie des souris (%survival) a été observée 100 jours après l'infection. (B) Les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose de 25.10⁶ pfu de HVH-1. La survie des souris, 100 jours après l'infection, a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K : K^b/K^b, K^b/K^{bm8} ou K^{bm8}/K^{bm8}. Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

Question 2. Analyser les résultats présentés sur la Figure 1. (10 lignes maximum)

Question 3. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre pour rendre compte de ces observations ? (8 lignes maximum)

Dans la suite de leur étude, les auteurs analysent la survie des souris B6 ou bm8 déficientes en cellules T CD8 (Figure 2A) ou en cellules NK (Figure 2B) après infection avec une dose donnée de HVH-1. Dans une autre expérience, la survie de souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8, après transfert, ou non, de cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 ou bm8, a été observée après infection avec une dose létale de HVH-1 (Figure 2C).

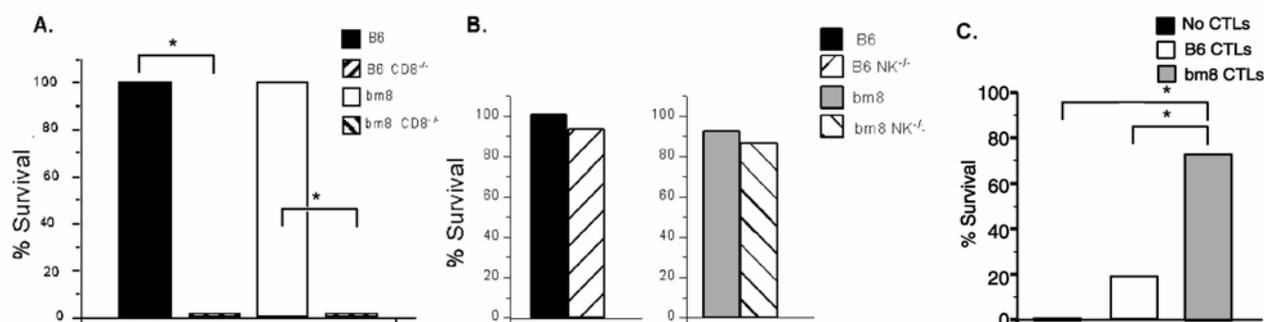


Figure 2 : (A) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules T CD8 (B6 CD8^{-/-} et bm8 CD8^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10⁶ pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (B) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules NK (B6 NK^{-/-} et bm8 NK^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10⁶ pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (C) Des souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8 ont reçu, ou non (no CTLs), des cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 (B6 CTLs) ou de souris bm8 (bm8 CTLs). Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

- Question 4.** Citer deux moyens par lesquels les auteurs ont pu obtenir des souris déficientes en cellules T CD8. (5 lignes maximum)
- Question 5.** Pour quelle raison les auteurs choisissent-ils d'étudier des souris déficientes en cellules T CD8 ou en cellules NK ? (5 lignes maximum)
- Question 6.** Analyser les résultats présentés sur la Figure 2. (15 lignes maximum)
- Question 7.** Ces résultats confirment-ils les hypothèses émises à la Question 3 ? (5 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs ont étudié le répertoire TCR β des cellules T CD8 de souris B6 ou bm8 infectées par le virus HVH-1 ou par un autre virus, le virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p chez les souris infectées par HVH-1 (Figure 3A) et parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide « Inf-ASN » chez les souris infectées par le virus Influenza (Figure 3B). On précise que, chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide « Inf-ASN » présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

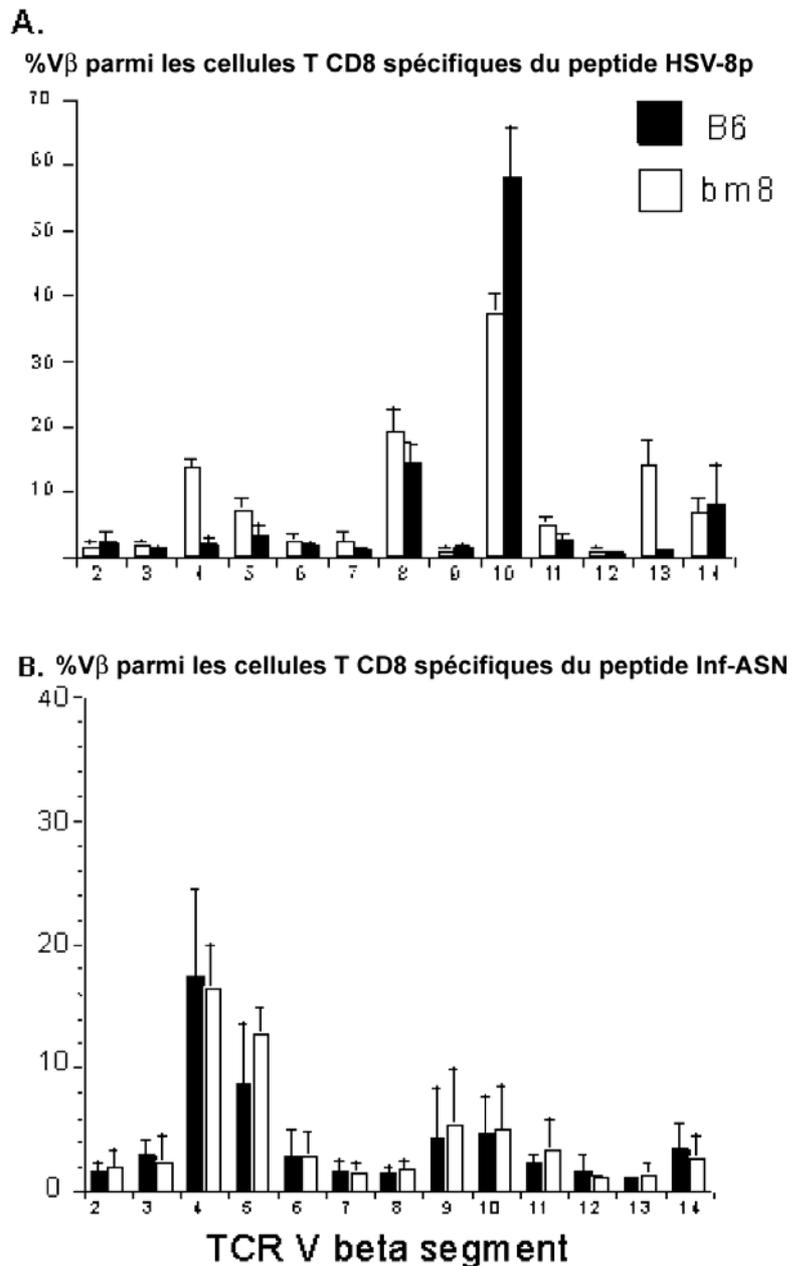


Figure 3: (A) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par le virus HVH-1. Le pourcentage d'expression des segments Vβ du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p. (B) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par un virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments Vβ du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide Inf-ASN. N.B. : Chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide Inf-ASN présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

- Question 8. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez le mécanisme de génération de la diversité des anticorps et TCR.
- Question 9. Analysez les résultats présentés sur la Figure 3. (8 lignes maximum)
- Question 10. Sur la base de ces derniers résultats, comment interprétez-vous la différence de susceptibilité à l'infection par le virus HVH-1 chez les souris B6 et bm8 ? (8 lignes maximum)